

Záróbeszámoló

A pályázat címe: Wnt fehérjék és Wnt receptorok

OTKA azonosító: 75836

A kutatási téma ismertetése: előzmények és a kutatás célja

Bevezetés:

A Wnt család fehérjei kulcsszerepet játszanak az embrionális fejlődés, a sejt differenciáció, az összejt proliferáció folyamataiban, de szerepük van az öregedési folyamatokban is. A Wnt jelátvitel aberráns aktiválódása számos fejlődési rendellenességet okoz, de sok esetben a daganatos elváltozások hátterében is a Wnt rendszer rendellenes működése áll. A legjobban ismert Wnt jelátviteli útvonalak a Wnt/ β -katenin vagy kanonikus útvonal, amely a célgének transzkripcióját és ezen keresztül a sejt differenciációt szabályozza és a β -katenintől független nem-kanonikus útvonalak, mint a "planáris sejt polaritás" (PCP) és a Wnt/Ca vagy Protein Kináz C függő útvonal. Az előbbi a citoskeletális aktivitás szabályozásában, az utóbbi a sejtadhéziós folyamatok szabályozásában játszik kulcsszerepet.

A Wnt-k extracelluláris glikoproteinek, melyek lipid oldalláncokat is tartalmaznak. A palmitoil oldalláncok szükségesek a kanonikus típusú jelátvitelhez, de szerepük nem teljesen tisztázott.

A Wnt fehérjék kétféle fehérje doménhez, a Frizzled és Ror receptorokban és a Wnt antagonista sFRP-kben megtalálható FRZ-doménhez, valamint a WIF-1 (Wnt Inhibitor Factor-1) fehérjében azonosított WIF-doménhez kötődnek.

A Frizzled fehérjék hét-transzmembrános "multipass" receptorok, az extracelluláris FRZ-doménjük révén nagy affinitással kötik a különböző Wnt-eket. A kanonikus út esetében az aktív Wnt-Frizzled receptor komplex kialakulásához koreceptorok, az LRP5/6 (low density lipoprotein related protein 5 és 6) jelenlétére is szükség van. A FRZ-domén más egy-transzmembrános receptor fehérjékben, a Ror tirozin kinázokban is megtalálható. Számos bizonyíték van arra, hogy a Ror tirozin kinázok a β -katenintől független nem-kanonikus útvonalak receptorai. Ennek a β -katenintől független útvonalnak a működéséről még keveset tudunk.

A FRZ-domének mellett a másik ismert Wnt-kötő domén, a WIF-1 (Wnt Inhibitory Factor-1) fehérje WIF-doménje. A WIF-domén nagy affinitással köti a különböző Wnt-eket, annak ellenére, hogy szerkezetileg teljesen különbözik a FRZ-doméntől. A kötésben a Wnt-k palmitoil-oldalláncainak is kulcsszerepe van. Korábbi NMR spektroszkópiai vizsgálataink a WIF-domén felszínén egy hidrofób felszínt azonosítottak, melyről feltételeztük, hogy szerepet játszhat a Wnt-fehérjék palmitoil-oldalláncának kötésében (Liepinsh E, Banyai L, Patthy L, Otting G. (2006). NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. J Mol Biol 357: 942–950).

A WIF-domén megtalálható egy atipikus receptor tirozin kináz, a RYK transzmembrán fehérje extracelluláris régiójában (Patthy L. (2000) The WIF module. Trends Biochem Sci. 25:12-3) A RYK a Wnt3a közvetített kanonikus és a Wnt5a közvetített nem-kanonikus jelátvitelben is képes részt venni. Kimutatták, hogy a RYK/Wnt5a jelátviteli út az idegrendszer kialakulásánál az axonvándorlásban játszik alapvető szerepet. Orvosbiológiai szempontból jelentős megfigyelés, hogy a RYK/Wnt5a jelátviteli út gátlása serkenti a sérülést követő axonregenerációt.

A témával kapcsolatos korábbi eredményeink:

A Wnt Inhibitory Factor-1 szekretált fehérje, amelyet egy ~150 aminosavból álló N-terminális un. WIF-domén, öt EGF-like domén és egy C-terminális hidrofób domén épít fel. Az izolált WIF-domén hasonló affinitással köti a Wnt-ket, mint a teljes hosszúságú molekula. Bakteriális expressziós rendszerben előállítottuk a WIF-1 fehérje WIF-doménjét és Gottfried Otting vezette NMR spektroszkópiás laboratóriummal (Research School of Chemistry, Australian National University, Canberra, Australia) együttműködve meghatároztuk a domén háromdimenziós szerkezetét. Kimutattuk, hogy a refoldinghoz használt polyoxyethylene lauryl ether (Brij-35) detergenst a WIF-domén nagy affinitással köti. A detergens alkil lánc és a WIF-domén között megfigyelt intermolekuláris NOE révén azonosítottuk azokat az oldalláncokat, amelyek ezt a hidrofób, un. alkil-kötőhelyet alkotják. Felvetettük, hogy a WIF-domén és a Wnt-k közötti kölcsönhatás kialakításában az alkil-kötőhelynek fontos szerepe lehet, mert ez a hidrofób felszín kötheti meg a Wnt-k palmitoil-oldalláncát (Liepinsh E, Banyai L, Patthy L, Otting G. (2006). NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. J Mol Biol 357: 942–950).

Érzékeny homológia detektálási módszerekkel kimutattuk, hogy a RYK receptor tirozin kináz extracelluláris régiója tartalmaz egy WIF domént (Patthy L (2000) The WIF module. Trends Biochem Sci. 25:12-3). Jóslatunkat, mely szerint a RYK receptor tirozin kináz WIF doménje révén WNT fehérjéket köt, azóta kísérletesen igazolták.

A kutatás célja:

A Wnt család fehérjéi kulcsszerepet játszanak az embrionális fejlődés, sejt differenciáció, őssejt proliferáció folyamataiban, de alapvető biológiai szerepük ellenére nagyon keveset tudunk a fehérjék szerkezetéről és szerkezet-funkció összefüggéseiről. A vizsgálatunk célja, hogy rekombináns úton előállítsuk a Wnt jelátvitel legfontosabb extracelluláris komponenseit: Wnt fehérjéket (pl. Wnt3a, Wnt5a) és fragmentjeiket, továbbá Wnt-kötő fehérjéket (WIF-1 fehérje WIF-doménje, RYK receptor tirozin kináz WIF-doménje), meghatározzuk a rekombináns Wnt fragmentek oldatszerkezetét, jellemezzük a Wnt-k/Wnt fragmentek és a Wnt-kötő fehérjék kölcsönhatását SPR módszerrel, valamint site-directed mutagenézis segítségével azonosítsuk a kölcsönható partnerek kötőfelszíneit.

Elért eredmények:

A rekombináns fehérjék előállítása

- 1. Rekombináns WIF-1 WIF-domének előállítása (alanin- és arginin-scanning mutagenézis)*

Korábbi NMR spektroszkópiai vizsgálataink során meghatároztuk a humán WIF-1 fehérje WIF-doménjének térszerkezetét (Liepinsh E, Banyai L, Patthy L, Otting G. (2006) NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory

factor-1. J Mol Biol 357: 942–950). Ezek a vizsgálatok a WIF-domén felszínén egy hidrofób felszínt (alkil-kötőhely) azonosítottak, amelynek kialakításában a I31, F42, F46, Y13, W15, I25, L32 aminosavak oldalláncái vesznek részt. Feltételeztük, hogy ez a kötőhely szerepet játszhat a Wnt-fehérjék palmitoil-oldalláncának kötésében.

Hipotézisünk igazolására a WIF-domén olyan mutánsait állítottuk elő, amelyekben a hidrofób felszínt alkotó aminosavakat alaninra cseréltük ki (I31A, F42A, F46A, Y13A, W15A, I25A, L32A). Az alanin-scanning mutagenézisbe további aminosavakat is bevontunk. Az F65 és W67 aminosavak mutagenézisét az indokolta, hogy a WIF-doménon feltételezett palmitoil-kötőhely azonosítását célzó számítógépes dokkolás (Malinauskas, 2008, Docking of fatty acids into the WIF domain of the human Wnt inhibitory factor-1. Lipids 43:227-30) szerint a kötőhely kialakításában elsősorban ez a két aminosav játszik szerepet. A további pozíciók kiválasztása a WIF-domént tartalmazó ortológ és paralóg fehérjék szekvenciájának bioinformatikai elemzésén alapult. Az elemzés szerint feltételezhető volt, hogy a Q20, D45, E78, D86 és K151 aminosavak szerepet játszhatnak a WIF-domén és a Wnt-k közötti kölcsönhatás kialakításában. A rekombináns fehérjéket *Pichia pastoris* expressziós rendszerben állítottuk elő és a szerkezeti integritásukat CD spektroszkópiával ellenőriztük. Az F65A és W67A mutánsok kivételével mindegyik fehérje szekretálódott a táptalajba. A rekombináns fehérjék CD spektroszkópiás vizsgálata (spektrum, Tm) szerint a D86A mutáns kivételével a mutációk a fehérjék térszerkezetét nem változtatták meg.

Az alanin-scanning mutagenézissel előállított WIF-mutánsok vizsgálata azt mutatta, hogy Wnt-affinitásuk egyetlen esetben sem tért el jelentősen a vad típustól, ezért olyan WIF-domén mutánsokat állítottunk elő, amelyekben a kiválasztott pozíciókban lévő aminosavakat (az alkil-kötőhelyet alkotó és az azt körülvevő aminosavakat) argininre cseréltük ki (Y13R, W15R, Q20R, I25R, F27R, E28R, I31R, L32R, F42R, H44R, D45R, F46R, F65R, E78R, D86R). Az arginin-scanning mutagenézistől azt vártuk, hogy a „drasztikusabb” változás jelentősebben befolyásolja a domén Wnt-kötő affinitását, mint az alanin-scanning mutagenézis esetén. A rekombináns fehérjéket az alaninos mutánsokhoz hasonló módon állítottuk elő és szerkezeti integritásukat most is CD spektroszkópiával ellenőriztük. Az élesztő az E28R mutánszt leszámítva valamennyi rekombináns fehérjét termelte. A mutánsok CD spektroszkópiás analízisével (spektrum, Tm) kimutattuk, hogy a D45R, F46R, F65R, E78R, D86R mutációk jelentős hatással vannak a domén térszerkezetének stabilitására, ugyanakkor a Y13R, W15R, Q20R, I25R, F27R, I31R, L32R, F42R, H44R mutánsok térszerkezete megegyezett a vad WIF-doménével. **(Bányai L, Kerekes K, Patthy L. (2012) Characterization of a Wnt-binding site of the WIF-domain of Wnt inhibitory factor-1. FEBS Lett. 586(19):3122-6)**

A Wnt fehérjék és a WIF mutánsok közötti kölcsönhatás jellemzése

A vad típussal megegyező szerkezetű WIF-domén fehérjék funkcionális jellemzését SPR (felületi plazmon rezonancia) módszerrel végeztük. Az SPR vizsgálatokhoz használt Wnt fehérjéket (Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt9b, Wnt11) kereskedelmi forrásból szereztük be. Megállapítottuk, hogy a WIF-domén nagy affinitással köti a vizsgált Wnt fehérjéket ($10^{-10} \text{ M} < K_d < 10^{-8} \text{ M}$, lásd táblázat) és a kapott egyensúlyi disszociációs konstansok hasonlóak a teljes WIF-1 fehérjére kapott értékekhez.

Interacting proteins	K_d (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
WIF – Wnt3a	4.0×10^{-9}	1.5×10^5	6.0×10^{-4}
WIF – Wnt4	2.2×10^{-9}	1.1×10^5	2.4×10^{-4}
WIF – Wnt5a	7.8×10^{-10}	1.4×10^5	1.1×10^{-4}
WIF – Wnt7a	2.9×10^{-9}	1.1×10^5	3.2×10^{-4}
WIF – Wnt9b	1.3×10^{-9}	1.1×10^5	1.5×10^{-4}
WIF – Wnt11	1.6×10^{-9}	2.8×10^5	4.4×10^{-4}

Az alanin-scanning mutagenézis segítségével előállított WIF-domének SPR analízisével kimutattuk, hogy egyik pontmutáció sem vezetett a fehérjék Wnt-kötő képességének drasztikusabb csökkenéséhez vagy megszűnéséhez. Eredményeinket úgy értelmeztük, hogy a kiterjedt Wnt-kötőhelyek kialakításában számos oldallánc vesz részt, ezért nem vezetett egy-egy pozíciónak a kisméretű alaninra történő cserélése a Wnt-kötés megszűnéséhez. Mivel nem nyertünk meggyőző bizonyítékot a kötőhelyek lokalizációjára vonatkozóan, ezért olyan WIF-domén mutáns sorozatot előállítottunk elő, melyekben argininre cseréltük a kiválasztott pozíciókban található aminosavakat azt remélve, hogy a drasztikusabb következménnyel járó csere jelentősebben módosíthatja a domén Wnt affinitását.

A mutáns WIF-domének Wnt-affinitásai közötti különbség megbízhatóbb mérésére a kompetíciós SPR technikát alkalmaztunk. Kimutattuk, hogy a vizsgált mutánsok nagyobb hányadánál (Q20R, I31R, F65R, D86R, E78R, K151R) a Wnt5a-kötő affinitás nem különbözött jelentősen a vad WIF-doménre kapott értéktől.

Három WIF-domén mutáns esetében (I25R, F42R, D45R) azonban a drasztikus aminosavcsere a domén Wnt5A-kötő affinitásának szignifikáns csökkenését eredményezte. Meglepő módon a Y13, W15, L32 aminosavak argininre történő cseréje a WIF-domén Wnt5a affinitásnak növekedését eredményezte. Korábban kimutattuk (Liepinsh E, Banyai L, Patthy L, Otting G. (2006). NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. *J Mol Biol* 357: 942–950), hogy WIF-domén Y13, W15, I25, L32 és F42 oldallánca a polyoxyethylene lauryl ether (Brij-35) különböző részeinek kötésében vesz részt. A kompetitív SPR mérések eredményeit figyelembe véve kijelenthető, hogy a korábban a WIF-doménen azonosított alkil-kötőhely alapvető szerepet játszik a Wnt-kötésben.

Direkt SPR mérésekkel meghatároztuk néhány mutáns Wnt5a affinitását, a kötéserősségi sorrend követte a kompetitív SPR-ből származó sorrendet (K_d F42R = $3,46 \times 10^{-9}$ M, K_d vad = $1,04 \times 10^{-9}$ M, K_d W15R = $2,15 \times 10^{-11}$ M), a Wnt5a fehérjét az F42R WIF-doménmutáns köti a leggyengébben és a W15R WIF-domén mutáns a legerősebben.

Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a Wnt-kötőhely egyik szubrégiója, amelyhez az I25, F27 és F42 aminosavak tartoznak, a Wnt fehérjék palmitoil-csoportját köti. Az I25, F27 és F42 aminosavak hidrofíl argininre történő cseréje a szubrégió és Wnt lipidoldallánca közötti hidrofób kölcsönhatás gyengülését okozza. A Wnt-kötőhely másik szubrégiója, az Y13, W15 és L32 aminosavakkal, valószínűleg nem vesz részt a palmitoil kötésben. Mivel az Y13R, W15R és L32R mutánsok Wnt5a-affinitása meghaladja a vad WIF-doménét, ez a szubrégió a Wnt5a aminosav-oldalláncainak kötésében játszhat kulcsszerepet. Ez a megfigyelésünk felvetette azt a lehetőséget, hogy a mutációk hatása a WIF-Wnt kölcsönhatásra Wnt-

ről Wnt-re változhat. Kompetitív SPR mérésekkel igazoltuk feltevésünket: a W15R mutáció például 5-szörös faktorral növelte a mutáns Wnt5a-affinitását, ugyanakkor 7-szeres faktorral csökkentette a Wnt3a-val szembeni affinitását, ami 35-szörös specifikus eltolódást jelent a két Wnt esetben.

Mutation	Wnt5a I ₅₀ ratio	Wnt3a I ₅₀ ratio	Shift in specificity IC ₅₀ Wnt3a/IC ₅₀ Wnt5a
Wild type	1.00	1.00	
Y13R	0.40	1.60	4.00
W15R	0.20	7.07	35.4
I25R	2.43	7.06	2.91
F27R	3.30	16.35	4.95
L32R	0.30	1.80	6.00
F42R	2.10	2.70	1.29

Méréseinkkel igazoltuk, hogy a korábban azonosított alkil-kötőhely egyik szubrégiója (az I25, F27 és F42 aminosavakkal) a Wnt fehérjék palmitoil-csoportját, a másik szubrégió (a Y13, W15 és L32 aminosavakkal) a Wnt fehérjék aminosav-oldalláncait köti, ezzel meghatározva a WIF-domén Wnt specifikitását. **(Bányai L, Kerekes K, Patthy L. (2012) Characterization of a Wnt-binding site of the WIF-domain of Wnt inhibitory factor-1. FEBS Lett. 586(19):3122-6)**

A kutatási téma további lehetséges irányai:

A Wnt fehérjék orvosi biológiai szempontból is kiemelkedő jelentőséggel bírnak, számos daganatos betegség hátterében a Wnt jelátviteli útvonal fokozott működése áll, de az idegi sérülést követő axonregenerációban is kulcsszerepet játszanak, ebben az esetben a jelátviteli út gátlása az axonregeneráció gyorsulását eredményezi.

Az a megfigyelésünk, hogy a WIF egyes oldalláncainak cseréje (Y13R, W15R, L32R) megnövelte a Wnt5a-affinitást, ugyanakkor csökkentette a Wnt3a-affinitást azt sugallja, hogy ezek az oldalláncok szerepet játszanak a Wnt specifikus meghatározásában. Az eredményeink ígéretesek abból a szempontból, hogy megnyílt az út olyan WIF variánsok létrehozására, amelyek specifikusan képesek az adott folyamat (különböző daganatos betegségek, axonregeneráció) hátterében álló Wnt fehérjét gátolni.

A domén Wnt-specifikitását meghatározó oldalláncok jövőbeni azonosítását nagymértékben segíti, hogy 2012-ben meghatározták egy Wnt8 röntgendiffrakciós szerkezetét (Janda CY, Waghay D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. (2012) Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. Science (6090):59-64.) A Wnt8 és a WIF-domén 3D szerkezetének ismeretében további WIF-oldalláncok mutagenizálását kezdtük meg, hogy a Wnt-kötés specifikitásáért felelős valamennyi oldalláncot azonosíthassuk.

Eltérések a beadott munkatervtől:

A beadott tervtől eltérően nem tudtuk vizsgálni a RYK receptor tirozin kináz WIF doménje és a Wnt fehérjék közötti kölcsönhatást, mivel nem sikerült a RYK receptor WIF-doménjét előállítanunk. A RYK receptor tirozin kináz WIF-doménjének előállítását megpróbáltuk a rendelkezésünkre álló valamennyi expressziós rendszerben, köztük a WIF-1 WIF-doménjénél sikeresen alkalmazott bakteriális és élesztő rendszerekben is. Az *E.coli*-ban történő expresszióhoz létrehozott vektor konstrukciók (pET15b_RYK, pCDFDuet1_RYK, pPR-IBA2_RYK) egyike sem vezetett sikerhez, a rekombináns fehérjét nem sikerült kimutatni egyik sejtfrakcióban sem. Hasonlóan negatív eredményre vezettek a *Pichia* expressziós rendszerrel végzett próbálkozásaink: sem az indukálható pPICZαA_RYK, sem a konstitutive pGAPZ_RYK vektorral transzformált sejtek nem termelték a rekombináns fehérjét. Megpróbáltunk rovar (*Drosophila* S2 sejtek) és emlős (HEK293T és CHO sejtek) expressziós rendszerekkel is, de sem a pMTBiPV5HisA_RYK plasmiddal transzfektált S2 sejtek, sem a pSecTag2HisA_RYK plasmiddal transzfektált emlős sejtek nem termeltek Western blot technikával kimutatható mennyiségben rekombináns fehérjét.

Feltételezzük, hogy a bakteriális és élesztő expressziós rendszerek esetén az eltérő kodonhasználat lemagyarázza az expressziósikertelenségét, ezért a RYK teljes extracelluláris régióját kódoló cDNS-t 23 pozícióban mutagenizáltuk, hogy jobban megfeleljen *Pichia* kodonhasználatának. Az ilyen módon „optimalizált” cDNS-t pPICZαA *Pichia* expressziós vektorba építettük és ezt a konstrukciót használjuk az élesztő expresszióhoz.

A munkatervtől eltérően még nem tudtuk vizsgálni a Wnt fragmentek és a WIF-domén közötti kölcsönhatást, mivel nem sikerült a rekombináns Wnt fragmenteket a vizsgálatokhoz szükséges mennyiségben előállítanunk.

A kötőhely doménszintű lokalizálását két módon kíséreljük meg.

1. Wnt fragmentek előállítása limitált proteolízissel teljes hosszúságú Wnt fehérjékből. Az ehhez szükséges Wnt-fehérjék expressziója és tisztítása folyamatban van, a Wnt3a és a Wnt5a fehérjéket kereskedelmi forrásból származó egér fibroblaszt-sejtek segítségével állítjuk elő. Az előkísérletek alapján a vizsgált proteázok közül a tripszinnel történő emésztés látszik a legígéretesebbnek.

2. Wnt fragmentek előállítása rekombináns DNS technológiával. Olyan vektor-konstrukciókat állítottunk elő, amelyek a Wnt-fehérjék N-terminális és C-terminális régióját kódolják. Előkísérletekben a Wnt7a fehérje ezen régióit *E.coli* és *Pichia pastoris* expressziós rendszerben is előállítottuk, de a tisztított fehérjék CD spektroszkópiás és NMR spektroszkópiás vizsgálata (Gottfried Otting, Canberra, Australia) azt mutatta, hogy a rekombináns fehérjék nem natív szerkezetűek, így alkalmatlanok további szerkezetbiológiai és funkcionális vizsgálatokra. A Wnt-fragmentek expresszióját emlős sejtekben (CHO illetve HEK293T) is megkíséreltük, a nagyon alacsony szintű expresszió miatt azonban egyelőre nem áll rendelkezésünkre megfelelő mennyiségű fehérje a további vizsgálatokhoz.